



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C07K 14/415, C12N 15/29, 15/82, 15/10, A01H 5/00	A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/64451 (43) Date de publication internationale: 16 décembre 1999 (16.12.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01342 (22) Date de dépôt international: 8 juin 1999 (08.06.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/07174 8 juin 1998 (08.06.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): KONDOROSI, Eva [HU/FR]; 10, allée de la Dame Alips, F-91190 Gif sur Yvette (FR). CEBOLLA, Angel [ES/FR]; 15, rue Juliette Adam, F-91190 Gif sur Yvette (FR). KONDOROSI, Adam [HU/FR]; 10, allée de la Dame Alips, F-91190 Gif sur Yvette (FR). (74) Mandataires: VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.; Cabinet Ores, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
(54) Title: PLANT PROTEIN WITH REPEATED WD40 MOTIFS, NUCLEIC ACID CODING FOR SAID PROTEIN, AND USES THEREOF (54) Titre: PROTEINE VEGETALE A MOTIFS WD40 REPETES, ACIDE NUCLEIQUE CODANT POUR LADITE PROTEINE, ET LEURS APPLICATIONS (57) Abstract <p>The invention concerns a plant protein with repeated WD40 motifs, characterised in that it belongs to the FZR sub-family, a purified nucleic acid fragment characterised in that it comprises all or part of a sequence coding for said plant protein and the uses of said protein and said nucleic acid fragment.</p> (57) Abrégé <p>Protéine végétale à motifs WD40 répétés, caractérisée en ce qu'elle appartient à la sous-famille FZR; fragment d'acide nucléique purifié caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence codant pour ladite protéine végétale; utilisations de ladite protéine et dudit fragment d'acide nucléique.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun		démocratique de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

PROTEINE VEGETALE A MOTIFS WD40 REPETES, ACIDE NUCLEIQUE
CODANT POUR LADITE PROTEINE, ET LEURS APPLICATIONS

L'invention est relative au clonage de gènes intervenant dans la régulation de la division cellulaire chez les végétaux, et à leurs utilisations.

La plupart des organes végétaux se développent après la germination, par différenciation à partir des méristèmes. Préalablement à la différenciation, se produisent dans les méristèmes le ralentissement puis l'arrêt du cycle de division cellulaire. Simultanément, on observe fréquemment une augmentation de la taille des cellules, et une répllication du génome non accompagnée de mitose, dénommée « endoréplication ». L'endoréplication est un phénomène bien connu lors du développement de tissus de réserve ; KOWLES [Genome, 35, pp. 68-77, (1992)] mentionne ainsi une ploïdie de 6C à 384C lors du développement de l'endosperme chez le maïs.

Les phénomènes intervenant lors de l'arrêt de la division cellulaire précédant la différenciation jouent un rôle essentiel dans le développement et l'ontogénèse végétale. Les mécanismes impliqués dans ces phénomènes sont encore mal connus ; il semble que l'inhibition du facteur promoteur de la phase M, et l'induction des protéine-kinases de la phase S (GRAFI, Science, 269, pp. 1262-1264, (1995)) seraient impliqués. Toutefois, on n'a jusqu'à présent identifié aucun facteur directement impliqué dans ce mécanisme chez les plantes.

Les Inventeurs ont entrepris l'étude de ce mécanisme, dans le but de découvrir des moyens de le contrôler, et d'agir par son intermédiaire sur le développement et l'ontogénèse végétale.

Ils ont choisi comme modèle d'étude le système symbiotique *Rhizobium*/légumineuses. Dans ce système, les facteurs Nod de nature lipooligosaccharidique, produits par les *Rhizobium*, constituent des signaux mitogènes qui induisent localement la formation d'un nouveau méristème,

à partir duquel se différencient les cellules formant les nodosités racinaires [TRUCHET, Nature, 351, pp. 670-673, (1991) ; YANG, Plant Cell, 6, pp. 1415-1426, (1994) ; SAVOURE, EMBO.J., 13, pp. 1093-1102, (1994)]. Les
5 nodosités comprennent 3 zones principales : une zone apicale, constituée de cellules méristématiques ; une zone intermédiaire d'invasion, ou de différenciation (zone II), où intervient l'infection des cellules par les bactéries, ainsi que l'arrêt de la division cellulaire,
10 accompagné d'endoréplication et d'augmentation de la taille des cellules, et suivi par leur différenciation ; et une zone de fixation (zone III), formée de cellules différenciées infectées par les bactéries, et où intervient la fixation de l'azote.

15 Au cours de cette étude, les Inventeurs ont isolé, à partir de nodosités de luzerne (*Medicago sativa*), un gène, dénommé ci-après *ccs52*, jouant un rôle essentiel dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'endoréplication. En utilisant une sonde d'ADNc du
20 gène *ccs52* de *Medicago sativa* ils ont également isolé un gène homologue chez *Medicago truncatula*.

Les gènes *ccs52* de *Medicago sativa* (*ccs52Ms*), et de *Medicago truncatula* (*ccs52Mt*) codent pour un polypeptide de 475 acides aminés, ayant une masse
25 moléculaire théorique de 52 kDa. Ces polypeptides sont respectivement dénommés ci-après CCS52Ms et CCS52Mt ; les séquences de CCS52Ms et CCS52Mt ne diffèrent que par 2 résidus en positions 16 (R/G) et 141 (V/I).

Ces 2 protéines comprennent des motifs WD
30 répétés, et peuvent ainsi être rattachées à la superfamille des protéines à motifs WD répétés.

Les motifs WD répétés comprennent environ 40 aminoacides contenant un certain nombre d'acides aminés conservés dont le motif WD (Trp-Asp) qui se situe
35 fréquemment à une extrémité du motif répété [NEER et al., Nature, 371, pp. 297-300, (1994)]. Les membres de cette

famille régulent différentes fonctions, telles que la transduction de signal, la transcription, l'épissage de pré-ARNm, l'organisation du cytosquelette, la fusion vésiculaire ou le cycle cellulaire. Bien que la structure générale soit globalement similaire dans toutes les protéines, la grande variété fonctionnelle des motifs WD répétés suggère que ces motifs se sont différenciés et sont devenus fonctionnellement spécialisés. Une homologie fonctionnelle se reflète dans le nombre de motifs WD répétés, par une homologie importante des motifs WD répétés à des positions équivalentes dans différentes protéines, par rapport à d'autres motifs répétés dans les mêmes protéines, et par une similarité significative des extrémités C et N terminales.

La comparaison de la séquence de CCS52Ms avec les séquences de protéines connues, en utilisant le programme GAP de GENETICS COMPUTER GROUP [paramètres : gap weight : 1,000 ; length weight : 0,100 ; average match : 0,540 ; average mismatch : 0,396] a fait apparaître une homologie élevée avec des protéines à motifs WD40 répétés qui interviennent dans la régulation du cycle cellulaire, et plus spécifiquement, avec les protéines FZR de *Drosophila* (57% d'identité), HCT1 de *Saccharomyces cerevisiae* (46% d'identité), et SRW1 de *Schizosaccharomyces pombe* (52% d'identité), qui appartiennent à la famille « fizzy-related » (FZR). Les recherches effectuées dans des bases de données de séquences en utilisant le programme BLAST [ALTSCHUL et al. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402, (1997)] ont également fait apparaître une homologie importante de CCS52Ms avec les protéines FZR de *Drosophila* (56% d'identité ; 70% de similarité), et SRW1 de *Schizosaccharomyces pombe* (51% d'identité ; 67% de similarité) mentionnées ci-dessus, ainsi qu'avec le produit du gène *fzr* de *X. laevis* (58% d'identité ; 73% de similarité).

Les protéines FZR induisent la dégradation des cyclines mitotiques, et interviennent dans la transition entre la prolifération et la différenciation cellulaire. Il a ainsi été montré chez la *Drosophile* que le gène *fzr* est exprimé en fin de prolifération cellulaire pendant l'embryogénèse. Le produit de ce gène entraîne une diminution des cyclines mitotiques, et est nécessaire pour l'arrêt de la prolifération cellulaire et le début des endocycles [SIGRIST et LEHNER, *Cell*, 90, pp. 671-681, (1997)]. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, HCT1 est nécessaire pour la protéolyse de la cycline mitotique, Clb2 [SCHWAB et al., *Cell*, 90, pp. 683-693, (1997)]. Chez *Schizosaccharomyces pombe*, le produit du gène *srw1* contrôle le cycle cellulaire et la différenciation en régulant négativement les complexes Cdc2/CDC13 (cycline de type mitotique) [YAMAGUCHI et al., *Mol. Biol. Cell.*, 8, 2475-2486, (1997)]. Les protéines FZR ont donc un rôle différent de celui des autres protéines à motifs WD répétés, qui interviennent au niveau de la prolifération cellulaire.

Chez les plantes, aucune protéine de la famille FZR n'a été décrite antérieurement à CCS52Ms.

L'existence d'un gène codant pour une protéine à motifs WD40 répétés et son isolement à partir d'ADNc de carotte ont été récemment décrits [LUO et al., *Plant Mol. Biol.*, 34, pp. 325-330, (1997)]. Cependant, le produit de ce gène présente une plus faible homologie (44% d'identité et 63% de similarité sur la comparaison de séquences effectuée avec le programme BLAST) avec la protéine CCS52Ms, que les protéines FZR d'invertébrés et de levure ; cette protéine de carotte est apparentée aux protéines cdc20, p55, et fizzy, et appartient donc à un sous-groupe de protéines à motifs WD40 répétés distinct du sous-groupe FZR.

La recherche d'homologues de CCS52Ms dans une base de données du génome d'*Arabidopsis thaliana* a fait

apparaître une séquence peptidique déduite d'un clone génomique (AB005230) et présentant 64% d'identité avec CCS52Ms, ce qui montre l'existence d'homologues du gène *ccs52Ms* chez d'autres plantes. Une autre séquence peptidique également déduite d'un clone génomique d'*Arabidopsis thaliana* (AL031018, publiée le 17 septembre 1998) présente 80% d'identité avec CCS52Ms (44% d'identité et 63% de similarité sur la comparaison de séquences effectuée avec le programme BLAST).

La figure 1A représente un dendrogramme de la famille des protéines à motifs WD40 répétés, qui montrent que les protéines CCS52 forment avec les autres protéines FZR, une sous-famille représentant une branche qui a évolué séparément de celles respectivement constituées par les protéines CDC20, P55, et fizzy.

Les figures 1B et 1C représentent l'alignement, effectué en utilisant le logiciel « PRETTYBOX », de la séquence CCS52 de *Medicago sativa*, (MsCCS52) et des séquences FZY et FZR de *Drosophila* (DmFZY et DmFZR), HCT1 de *Saccharomyces cerevisiae* (SchCT1), SRW1 de *Schizosaccharomyces pombe* (SpSRW1), FZY d'*Arabidopsis thaliana* (AtFZY), et des 2 polypeptides d'*Arabidopsis thaliana* (AtCCS52A = peptide déduit de AL031018, et AtCCS52B = peptide déduit de AB005230).

La protéine CCS52Ms contient 7 domaines à motifs WD40 répétés, situés dans les portions centrale et C-terminale de la molécule (l'emplacement de ces domaines numérotés de I à VII, est indiqué sur les figures 1B et 1C, au dessus de l'alignement des séquences). Ces domaines ne présentent que peu d'homologie entre eux, d'où l'on peut conclure qu'ils représentent des sites d'interaction avec des protéines différentes. Le dernier domaine (VII) comprend un site potentiel de liaison pour les cyclines.

Dans la partie N-terminale de la protéine CCS52Ms, sont localisées une séquence peptidique

(DRFIPSR) qui correspond à un motif présent chez les protéines FZR ainsi que chez d'autres protéines à motifs WD40 répétés telles que cdc20, p55 et fizzy, ainsi qu'une séquence peptidique (AYTTLLRTALFG) qui correspond à un motif spécifique de la famille FZR, absent des autres protéines à motifs WD40 répétés (l'emplacement de ces motifs, respectivement dénommés I et II, est indiqué sur la figure 1B au-dessus de l'alignement des séquences).

Des sites potentiels de phosphorylation par des CDK (cyclin dependent kinases ou kinases cyclines-dépendantes), sont localisés dans la portion N-terminale, aux positions 43 (SPSR), 99 (TPEK), 144 (SPVK), 154 (RSP), et 155 (SPYK), ainsi que dans la portion C-terminale à la position 454 (SPK), de CCS52Ms. Les sites situés aux positions 43 et 144 sont également présents chez d'autres protéines FZR, tandis que les sites situés aux positions 99, 154, et 155 paraissent plus spécifiques des protéines CCS52 de plantes ; le site C-terminal en position 454 apparaît également spécifique des protéines CCS52 de plantes.

Une séquence de 15 acides aminés RDNSPPPEPSPESLR commençant au résidu 16, et correspondant à un motif de dégradation protéique PEST est également présente dans la portion N-terminale de CCS52Ms. Ce motif permet probablement, par l'intermédiaire de la dégradation de CCS52, de réguler ses interactions avec d'autres protéines.

La structure de la protéine CCS52Ms est schématisée sur la figure 2, sur laquelle sont indiqués la position des motifs WD-40, des sites de phosphorylation (P), du motif PEST, et des motifs I et II.

La séquence de l'ADNc de *Medicago sativa* cloné par les inventeurs est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1 ; la

séquence de la protéine CCS52Ms correspondante est représentée sous le numéro SEQ ID NO:2.

La région 3' non-traduite du transcrit de cet ADN comprend 2 séquences AUUUA, qui correspondent à des
5 séquences d'instabilité des ARNm, et peuvent donc jouer un rôle pour réguler la quantité de transcrits de *ccs52*.

Les Inventeurs ont recherché la présence d'homologues de *ccs52Ms* par transfert de Southern, chez des espèces diploïdes et tétraploïdes de *Medicago*, ainsi
10 que chez d'autres plantes, en particulier le tabac, la tomate, la pomme de terre, le soja, le blé et le riz : dans tous les cas plusieurs bandes ont été détectées, ce qui indique que *ccs52* représente bien une famille de gènes végétaux apparentée à la famille *fzr*.

15 Les Inventeurs ont étudié *in vivo* l'activité de la protéine CCS52Ms et ont montré qu'elle intervenait dans la régulation de la différenciation cellulaire, en favorisant l'endoréplication. En particulier, l'expression de la protéine CCS52Ms dans des plantes
20 transgéniques induit chez celles-ci une augmentation de l'endoréplication et du niveau de ploïdie des cellules des plantes. Cet effet serait la conséquence d'un blocage de la mitose par l'activation de la dégradation des cyclines mitotiques, ce qui entraînerait une conversion
25 des cycles mitotiques en endocycles constitués des phases G1-S-G2. La répétition des endocycles a pour résultat l'amplification du génome et l'augmentation de la ploïdie, corrélée à une augmentation du volume cellulaire.

30 La présente invention a pour objet une protéine végétale à motifs WD40 répétés, dénommée CCS52, caractérisée en ce qu'elle appartient à la sous-famille FZR.

35 Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention ladite protéine végétale présente au moins 45%, et de préférence au moins 55% d'identité avec

le polypeptide de séquence SEQ ID NO:2 ou au moins 60% et de préférence au moins 70 % de similarité avec le polypeptide de séquence SEQ ID NO:2.

La présente invention englobe en particulier
5 la protéine CCS52Ms, ses isoformes, ainsi que les protéines autologues de *Medicago* et les protéines orthologues d'autres végétaux, pouvant être rattachées à la famille des protéines FZR.

L'invention englobe également des protéines
10 dérivées des protéines CCS52, par addition, délétion ou substitution d'un ou plusieurs acides aminés ou d'une ou plusieurs séquences d'acides aminés ; il peut s'agir par exemple de protéines dans lesquelles des modifications ont été apportées en dehors des régions fonctionnelles,
15 ou bien de protéines dans lesquelles des modifications ont été apportées pour modifier leur activité, par exemple de protéines stabilisées par délétion du motif PEST.

La présente invention a également pour objet
20 un fragment d'acide nucléique purifié, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence codant pour une protéine CCS52, telle que définie ci-dessus, ou de sa séquence complémentaire. Dans ce cadre, la présente invention englobe en particulier les ADNc et les ADN
25 génomiques des protéines CCS52.

Des fragments d'acide nucléiques, conformes à l'invention peuvent être aisément identifiés et clonés en criblant des banques d'ADNc ou d'ADN génomique de plantes à l'aide d'oligonucléotides dérivés de la séquence de
30 *ccs52Ms*, et notamment d'oligonucléotides dérivés des régions de cette séquence spécifiques des protéines FZR, et en particulier des protéines CCS52.

Les protéines CCS52 peuvent être produites, en particulier, en exprimant ces séquences d'acide nucléique
35 dans des cellules hôtes.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une protéine CCS52, telle que définie ci-dessus ou d'une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie de ladite protéine, ou de sa séquence
5 complémentaire, pour réguler la différenciation et la prolifération de cellules végétales.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une protéine de la sous-famille FZR ou d'une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou
10 partie de ladite protéine, ou de sa séquence complémentaire, pour réguler la différenciation et la prolifération de cellules végétales.

On peut citer parmi de telles protéines, la protéine FZR de drosophile ou la protéine FZR de levure.

15 La modification de l'expression et/ou de l'activité de protéines CCS52 dans des cellules de plantes permet de modifier le cycle cellulaire, en favorisant soit la prolifération soit la différenciation, et de contrôler ainsi le processus de développement, afin
20 d'obtenir par exemple une stimulation de l'embryogénèse somatique, d'augmenter la régénération *in vitro* de plantes à partir des cals, en augmentant la conversion en embryons, ou de favoriser le développement de certains organes, par exemple d'augmenter la productivité des
25 tissus de réserve en augmentant leur endoploïdie.

On peut en particulier utiliser les séquences d'ADNc de protéines CCS52 ou des portions de ces séquences d'ADNc, ou de leur transcrits sens ou antisens ; il peut s'agir par exemple de la totalité
30 d'une séquence codant pour une protéine CCS52Ms, ou d'une portion de cette séquence codante, et/ou de tout ou partie des régions 5' et 3' non traduites. Ces séquences peuvent être utilisées en orientation sens, ou si l'on souhaite inhiber l'expression de la protéine CCS52Ms dans
35 une plante ou dans un tissu ou organe de celle-ci, en orientation antisens.

La présente invention englobe également des constructions d'ADN recombinant, contenant au moins une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention.

Généralement, ladite séquence d'acide nucléique sera placée sous contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié.

Avantageusement, on pourra ainsi utiliser un promoteur fort, pour augmenter, dans les cellules hôte, les niveaux d'expression de la protéine CCS52 ; il pourra s'agir d'un promoteur inductible ou bien d'un promoteur constitutif, d'un promoteur ubiquitaire, ou d'un promoteur tissu-spécifique.

L'utilisation de promoteurs inductibles permet d'obtenir un blocage de la mitose, et l'induction de l'endoréplication au moment souhaité. L'utilisation de promoteurs tissu-spécifiques permet de cibler l'action de la protéine CCS52 sur certains tissus et organes (par exemple, des tissus de réserve).

A titre d'exemples de promoteurs forts utilisables dans le cadre de la présente invention, on citera : le promoteur CaMV35S [BENFLY et al, Science, 250, pp. 959-966, (1990)] ; le promoteur 35S ; les promoteurs *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA : nopaline synthase, octopine synthase, mannopine synthase, 1', 2' [SANDERS et al., Nucleic Acid Res., 15, pp. 1543-1558, (1987) ; HOOYKAAS and SCHILPEROORT, Plant. Mol. Biol., 19, pp. 15-38, (1992)].

A titre d'exemples de promoteurs inductibles utilisables dans le cadre de la présente invention, on citera : le promoteur inductible par la tétracycline [WEINMANN et al., Plant J., 5, pp. 559-569, (1994)] ; le promoteur inductible par le cuivre [METT et al., Transgenic Res., 5, pp. 105-113, (1996)] ; le promoteur inductible par les glucocorticoides [AOYAMA et CHUA, Plant. J., 11, pp. 605-612, (1997)].

A titre d'exemples de promoteurs tissu-spécifiques utilisables dans le cadre de la présente invention, on citera : le promoteur endosperme-spécifique [OPSAHL-FERSTAD et al., Plant J., 12, pp. 235-246, 5 (1997) ; DOAN et al., Plant Mol. Biol., 31, pp. 877-886, (1996) ; les promoteurs nodosités-spécifiques (*enod12A/B* ou leghémoglobine) [TRINH et al., Plant Cell Reports, (17, pp. 345-355, (1998) ; VIJN et al., Plant Mol. Biol., 28, pp. 1103-1110, (1995)] ou bien des promoteurs 10 précoces inductibles par le facteur Nod et des promoteurs tardifs (promoteur de la cycline D ou des nodulines tardives (type leghémoglobine) et promoteurs régulés par des hormones, tels que *parA/B* [TAKAHASHI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, pp. 8013-8016, (1990)], *GH3* 15 [LIU et al., Plant Cell, 6, pp. 645-657, (1994)].

L'Invention englobe en particulier des vecteurs recombinants portant au moins un insert contenant un fragment d'ADN conforme à l'invention. Ces vecteurs sont utilisables pour transformer des cellules 20 hôtes.

L'Invention a également pour objet des cellules et des organismes pluricellulaires transformés par au moins une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention ; il s'agit en particulier de cellules 25 végétales ou de végétaux.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, et se réfère à des exemples non limitatifs illustrant l'identification, le clonage et l'expression du gène 30 CCS52Ms.

EXEMPLE 1 : CLONAGE ET SEQUENCAGE D'UN ADNC DE CCS52MS.

Un clone d'ADNC de CCS52Ms a été obtenu par criblage différentiel à partir d'une banque d'ADNC de nodosités de *Medicago sativa*, fortement stimulées pendant 35 l'organogénèse nodulaire.

Le protocole suivant a été utilisé :

L'ADNc de *ccs52Ms* de *M. sativa* est isolé par la technique de DD-RT-PCR (Differential Display RT-PCR) [LIANG et PARDEE, Science, 257, pp. 967-971, (1992)], en utilisant les kits RNAimage[®] (GENHUNTER CORPORATION). Les
5 échantillons d'ARN sont isolés à partir de la zone racinaire sensible au facteur Nod de jeunes plants de *M. sativa* (croissance dans un milieu limité en nitrate), en l'absence de bactéries ou inoculés par des souches de *R. meliloti* Nod+ (EK1433) ou Nod- (EK133) pendant
10 4 jours. Le fragment de DD-RT-PCR *ccs52Ms*, présentant une augmentation de l'expression des nodosités, est cloné dans le vecteur de clonage pCT-TRAP (GENHUNTER CORPORATION) et utilisé comme sonde pour l'isolement des clones complets à partir d'une banque d'ADNc de nodosités
15 de *M. sativa* sp. *varia* A2, construite dans λ -ZAP (STRATAGÈNE) (CRESPI et al., EMBO J., 1994, 13, 5099-5112).

Sept clones d'ADNc, obtenus à partir de 2.10^5 phages représentent 2 types d'ADNc différant l'un de
20 l'autre uniquement au niveau de 4 acides aminés (16R-G, 17D-N, 33S-N, 52R-G) et de la longueur du fragment 3'UTR. Une identité de 99% des clones, au niveau de la séquence en acides aminés, suggère qu'ils représentent des allèles du même gène chez *M. sativa* tétraploïde allogame.

25 Le séquençage des ADNc de *ccs52Ms* est effectué avec le système ABIprism de PERKIN-ELMER.

Les clones génomiques *ccs52Ms* et *ccs52Mt* sont isolés à partir de banques génomiques de *M. sativa* cv. Nagyszénasi et *M. trucatula* ecotype GHOR, en utilisant
30 l'ADNc de *ccs52Ms* comme sonde d'hybridation. Ces banques génomiques sont construites par digestion partielle de l'ADN génomique avec l'enzyme de restriction MboI et le clonage des fragments d'ADN de taille comprise entre 15 et 20 Kb dans le site BamHI de λ -EMBL4.

EXEMPLE 2 : IDENTIFICATION DE LA FAMILLE DU GENE *CCS52MS* DANS *MEDICAGO* ET SON EXPRESSION DANS DIFFERENTS ORGANES VEGETAUX.

L'existence de copies multiples du gène *ccs52* est recherchée par hybridation de type Southern dans des cultivars tétraploïdes de *M. sativa* Nagyszénasi et Cardinal et chez *M. truncatula* diploïde autogame, une plante modèle dans la recherche sur les légumes.

L'ADN des plantes est isolé à partir des feuilles jeunes, en utilisant le kit d'extraction NUCLEON PHYTOPURE DNA (AMERSHAM).

Les échantillons d'ADN sont digérés par EcoRI et transférés sur membrane de nylon BIOTRANS (+) (ICN).

L'hybridation de Southern est réalisée conformément aux protocoles classiques [(SAMBROOK, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (1989) ; AUSUBEL, Current Protocols in Molecular Biology, (1989)], dans des conditions stringentes à 65°C (hybridation dans un tampon CG ; lavage : 2 x SSC, 0,1% SDS pendant 2 fois 15 mn, puis 0,5 x SSC, 0,1% SDS pendant 2 fois 30 min.).

L'expression de *ccs52Ms* est étudiée par analyse de Northern.

L'ARN total est isolé à partir de différents organes de *M. sativa* cultivar Sitel :

- à partir des racines, inoculées pendant 4 jours avec le mutant Nod- *R. meliloti* (EK133) et avec la souche surproductrice de facteurs Nod (EK1433) ;
- à partir des nodosités, 12, 19, 23 et 30 jours après une infection par *R. meliloti*, et,
- à partir des tiges, des hypocotyles, des feuilles, des bourgeons, des fleurs, des racines de plants de 3 jours, de 7 jours, des racines privées d'azote et ne présentant pas de pointes racinaires, des racines de 7 jours, sans pointes racinaires, mises en culture en présence de nitrate, des nodosités spontanées

développées en l'absence de *R. meliloti*, et des pointes racinaires ou de culture de cellules de *M. sativa* sp. *varia* A2.

100 mg de chacun des organes testés, collectés
5 sous azote liquide, sont utilisés pour l'extraction de l'ARN (RNEASY PLANT, QUIAGEN).

L'ARN est chargé (10 µg par ligne) sur un gel dénaturant (formaldéhyde) [SAMBROOK, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory
10 Press, New York, (1989)].

Le transfert d'ADN est effectué dans une solution de transfert 10 x SSC [CHOMCZYNSKI et al., Analytical Biochemistry, 221, pp. 303-305, (1994)].

Aussi bien dans le cas de l'hybridation
15 Southern que dans le cas de l'hybridation Northern, le fragment d'ADNc *ccs52Ms* est marqué avec du [α -³²P] dCTP (Kit MEGAPRIM, AMERSHAM). L'hybridation avec la sonde *Msc27* sert de contrôle pour le chargement de l'ARN [SAVOURE et al., EMBO J., 13, pp. 1093-1102, (1994)].

20 Les résultats du transfert de Southern montrent que la sonde s'hybride avec différents fragments *EcoRI* de l'ADN génomique de *M. sativa* ou *M. truncatula*, ce qui indique que *ccs52Ms* représente chez *Medicago*, une famille multigénique.

25 Les résultats du transfert de Northern obtenus avec l'ARN total de racines inoculées avec le mutant Nod⁻ EK133 de *R. meliloti*, ou avec la souche EK1433 surproductrice de facteurs Nod et avec l'ARN extrait des nodosités, 12, 19, 23 et 30 jours après infection avec
30 *R. meliloti* montrent qu'on n'observe dans l'ARN total de racines, qu'une faible quantité de transcrits, ce qui reflète la faible proportion des cellules impliquées dans l'organogénèse des nodosités par rapport au nombre total de cellules des racines. En revanche, dans les nodosités
35 de différents âges on observe un niveau élevé de

transcription, qui reflète la persistance des méristèmes apicaux et des zones de différenciation.

Les résultats de transfert de Northern obtenus avec les ARN totaux de : 1: culture de cellules de *M. sativa* sp. *varia* A2, 2: tiges, 3: hypocotyles, 4: feuilles, 5: bourgeons floraux, 6: fleurs, 7: racines de pousses de 3 jours, 8: racines de pousses de 7 jours, privées d'azote, dépourvues d'extrémité, 9: pointes racinaires de 7 jours, cultivées en présence de nitrates, 10: dépourvues d'extrémité, 10: nodosités spontanées développées en absence de *R. melioli*, 11: nodosités fixatrices d'azote, 12: extrémités de pointes racinaires, montrent que l'expression du *ccs52Ms* n'est pas limitée aux nodosités, bien que cet organe soit celui qui 15 contienne le niveau de transcrits le plus élevé.

Ces transcrits sont en effet présents en quantités variables pratiquement dans tous les organes, ce qui indique que cette protéine intervient dans le développement de chacun d'entre eux. Mis à part les 20 nodosités, le niveau de transcription est également élevé chez les jeunes pousses, et dans les cultures cellulaires, où l'on détecte en outre un ARNm de plus petite taille qui peut correspondre soit à une polyadénylation différente, soit à l'expression d'une 25 copie homologue du gène.

Des analyses par hybridation *in situ* ont également été effectuées, et montrent que l'ARNm de *ccs52Ms* est localisé principalement dans la zone de différenciation, et en particulier à l'interface entre 30 les zones II et III de la nodosité, qui sont les régions où la différenciation est la plus active.

Parallèlement, on observe dans les mêmes zones une expression des cyclines de type G1 et mitotiques, ainsi que de l'histone H3 spécifique de la phase S.

35 Ceci indique que *CCS52Ms* intervient dans la régulation du cycle cellulaire, probablement d'une

manière similaire à ses homologues de la levure et de la drosophile, c'est-à-dire par l'intermédiaire de la protéolyse de cyclines mitotiques, qui inhibe la mitose et induit des cycles d'endoréplication.

5 **EXEMPLE 3 : EXPRESSION DE CCS52MS CHEZ**
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE

L'expression de CCS52Ms a été étudiée chez *S. pombe* chez qui un homologue fonctionnel (SRW1) a été décrit récemment (YAMAGUCHI, publication précitée). Le gène codant pour CCS52Ms a été cloné dans le plasmide pREP1 sous contrôle du promoteur *nmt1* répressible par la thiamine.

L'ADNc de *ccs52Ms* obtenu après coupure de λ -ZAP (STRATAGÈNE) est digéré avec AgeI et partiellement avec EcoRV. Le fragment AgeI-EcoRV de 1,6 kb représentant la région codante, à l'exception des 4 premiers codons, est cloné dans un vecteur SKII BLUESCRIPT (STRATAGÈNE) digéré par XmaI (compatible avec AgeI) et EcoRV. A partir de ce plasmide (pSK52B), l'ADNc de *ccs52Ms* est coupé par digestion BamHI-EcoRV et cloné dans les sites BamHI-SmaI du plasmide pREP1 [MAUNDRELL et al., Gene, 123, pp. 127-30, (1993)]. Pour générer un cadre de lecture en phase avec le codon de traduction ATG présent dans le vecteur sous contrôle du promoteur *nmtI*, l'ADN est digéré avec BamHI et l'extrémité 5' est complétée en présence d'enzyme de Klenow et de dNTPs. La religature des extrémités à bouts francs entraîne une fusion correcte, également vérifiée par séquençage. Ce plasmide, dénommé pREP52, est utilisé pour transformer des cellules compétentes *S. pombe* SP-Q01 et les transformants sont sélectionnés sur des plaques d'agar EMM-thiamine, en utilisant le kit ESP (STRATAGÈNE). Les vecteurs pREP1 [MAUNDRELL et al., Gene, 123, pp. 127-30, (1993)] et pESP1 (STRATAGÈNE) sont utilisés comme contrôles négatifs ; le contrôle positif est constitué par *srw1*

cloné dans pREP1 [YAMAGUSHI et al, Mol. Biol. Cell., 8, pp. 2475-2486, (1997)].

Les transformants de *S. pombe* SP-Q01 sont cultivés dans 2 ml de milieu EMM-thiamine 5 μ M pendant 32 h à 30°C. Les cellules sont lavées 2 fois avec 10 ml d'eau stérile et remises en suspension dans 5 ml de milieu EMM. Les suspensions cellulaires sont divisées en deux moitiés : 2,5 ml sont cultivées avec de la thiamine et 2,5 ml sont cultivées sans thiamine, à 30°C. Des aliquots de cultures sont prélevés après 16 h et 24 h de culture et fixés avec de l'éthanol, colorés avec du DAPI ou de l'iodure de propidium pour une analyse en cytométrie de flux et en microscopie [BEACH et al, Curr. Genet., 10, pp. 297-311, (1985)].

En présence de thiamine, l'expression de CCS52Ms est réprimée et on observe une croissance normale.

En l'absence de thiamine, l'expression de CCS52Ms entraîne l'inhibition de la croissance de *S. pombe*, qui s'accompagne d'une endoréplication comme l'illustre la figure 3B, qui montre la présence de noyaux $\geq 4C$, qui n'est pas observée dans les cellules contrôles de *S. pombe*, portant le vecteur vide pREP1 (figure 3A).

La morphologie des cellules est également modifiée par l'expression de CCS52Ms. On observe un allongement des cellules et une augmentation de la taille des noyaux, identiques à ceux observés lors de l'expression de SRW1 [YAMAGUSHI et al, Mol. Biol. Cell., 8, pp. 2475-2486, (1997)], tandis qu'aucun changement morphologique n'est observé lorsque *S. pombe* ne porte que le vecteur pREP1.

Chez *S. pombe*, SRW1 est essentiel pour la dégradation de la cycline mitotique CDC13. Pour vérifier si CCS52 agit de la même manière, la quantité de CDC13 a été évaluée dans des cultures d'une souche (SY1) de *S.*

pombe, porteuse d'une délétion dans le gène *srw1*, et ne dégradant pas CDC13.

Les protéines totales obtenues à partir de cultures de SY1 transformées avec pREP1 (témoin) ou avec pREP1-*ccs52* ont été analysées par transfert de Western, et révélation à l'aide d'anticorps anti-CDC13.

Parallèlement, l'expression de la kinase CDC2 et celle de l' α -tubuline ont respectivement été évaluées par révélation à l'aide d'anticorps anti-PSTAIR et anti α -tubuline.

Les résultats obtenus montrent une réduction très importante de la CDC13 dans les cellules transformées avec pREP1-*ccs52* par rapport aux cellules témoin. En revanche, il n'y a aucune variation de la CDC2 et de l' α -tubuline.

Ces résultats confirment que CCS52 est un équivalent fonctionnel de SRW1.

EXEMPLE 4 : OBTENTION DE PLANTES TRANSGENIQUES TRANSFORMEES PAR LE GENE CCS52MS.

1° Expression d'un transcrit antisens et son action sur le niveau de ploïdie de *Medicago truncatula*.

Dans un premier temps, le niveau de ploïdie de différents organes de *Medicago truncatula* (plante naturellement diploïde) a été déterminé, par cytométrie de flux, chez des plantes non-transformées.

La technique utilisée est la suivante :

L'ADN nucléaire des plantes fraîchement récoltées est analysé par cytométrie de flux (EPICS V, Coulter), conformément à la méthode de BROWN et al., (*A laboratory guide for Cellular and Molecular plant Biology*, 1991, 326-345, ed. Negrutiu et al., Birkhäuser, Basel), modifiée de telle sorte que les noyaux soient colorés avec du DAPI à une concentration finale de 5 μ g/ml. Le tampon nucléaire I est utilisé à 1% de Triton X-100 pour les nodosités.

Dans les jeunes pousses, on trouve une quantité d'ADN de 2C à 8C dans la racine et le cotylédon, alors que l'hypocotyle contient également des noyaux à 16C. Chez les plantes adultes, les feuilles sont
5 diploïdes, contenant 95% de noyaux à 2C et 5% de noyaux à 4C. Dans les pétioles et les nodosités, des noyaux de 2C à 32C ont été détectés. Toutefois, le pétiole contient majoritairement des noyaux à 2C, alors que les nodosités contiennent majoritairement des noyaux à 4C.

10 Un fragment SstI-PvuII de 1,2kb contenant les 3/4 de la séquence codante de *ccs52Ms*, a été placé en orientation antisens sous contrôle du promoteur 35S, dans un vecteur binaire obtenu à partir du vecteur pGPTV-BAR, portant le gène *bar* de résistance à l'herbicide BASTA
15 comme marqueur de sélection, et des sites de clonage multiple. Cette construction est obtenue en insérant le promoteur 35S dans un fragment HindIII-XbaI (obtenu à partir de pBI121, CLONTECH), dans les sites HindIII-XbaI du vecteur pGPTV-BAR. Le gène *uidA* est ensuite éliminé du
20 plasmide pGPTV-BAR par digestion XbaI-SstI au niveau du site multiple de clonage.

Pour obtenir la construction antisens de *ccs52Ms*, le fragment SstI-PvuII de 1,2 kb est cloné au niveau des sites SmaI-SstI du vecteur binaire ainsi
25 obtenu.

Ces plasmides ainsi qu'un plasmide contrôle, contenant le gène *gus* au lieu de la construction *ccs52* antisens ont été introduits dans *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105) par électroporation et utilisés pour
30 transformer *Medicago truncatula* R108-1 selon le protocole décrit par HOFFMANN et al. [Mol. Plant Microbe Interaction, 10, pp. 307-315, (1997)] ; TRINH ET AL. [Plant Cell Reports, 17, pp. 345-355, (1998)].

Le niveau de ploïdie des plantes transgéniques
35 obtenues a été analysé, comme décrit ci-dessus et le niveau de transcrits endogènes a été évalué par RT-PCR.

Pour discriminer les transcrits endogènes de *ccs52Mt* des transcrits antisens, on utilise pour les transcrits endogènes la paire d'amorces P55CL/P55CR et pour les transcrits antisens, la paire d'amorces P55BL/P55CR.

- 5 P55BL : TTTGGGGGTTGATGATTGTG
P55CL : CTCTCTACCGTTCTATCTCTTGGGA
P55CR : GGTAAGATGCTACTTTGGTGGTGT

La position de ces amorces est schématisée sur la figure 4.

- 10 La figure 5A montre les résultats d'évaluation de la quantité de transcrits *ccs52Mt* endogènes :

- par RT-PCR (□) dans les lignées transgéniques A1 A3 A4 A7 et A32 et dans les plantes témoin contenant le gène *gus* (C_{2n}), et
- 15 - par transfert de Northern (■) dans les plantes A4 et C_{2n} .

- Les résultats d'analyse en cytométrie de flux sont illustrés par la figure 5B, pour les pétioles de plantes témoin contenant le gène *gus*, diploïdes (C_{2n}) ou
- 20 tétraploïdes (C_{4n}), et de plantes de la lignée A4.

- Sur 38 plantes transgéniques régénérées, 3 (A4, A7 et A32) ont montré une endoploïdie significativement réduite, et notamment la plante A4. C'est également dans cette lignée que le niveau d'expression des transcrits
- 25 endogènes de *ccs52Ms* est le plus faible, comme le montre la figure 5B. Le fait qu'une réduction de l'endoploïdie n'ait jamais été observée auparavant chez d'autres plantes transgéniques et ne soit pas observée chez les plantes témoin, permet d'attribuer ce phénomène à
- 30 l'altération de l'expression de *CCS52Ms*, et non à un effet secondaire de la transgénése.

- En outre, la plante A4 produit une quantité de graines significativement inférieure à celle des plantes témoin. D'autre part, elle forme moins de rameaux
- 35 latéraux, et n'a développé que 2 nodules au niveau des

racines, au lieu des 50 nodules en moyenne développés par les plantes témoin cultivées dans les mêmes conditions.

L'impact de la suppression partielle de l'expression de *ccs52* sur le développement des organes de la plante a également été déterminé. Dans ce but, la
5 la largeur des pétioles a été mesurée et corrélée avec de pourcentages de noyaux endorépliqués (>4C), chez la génération T1 issue de la lignée A4 et chez les plantes témoins C_{2n} et C_{4n}.

10 Les résultats sont illustrés par la Figure 6. La Figure 6A qui représente la largeur du pétiole en fonction du pourcentage de cellules polyploïdes montre que, chez les plantes témoin C_{2n} (18 plantes), la largeur des pétioles varie en corrélation avec le nombre de
15 cellules diploïdes. Dans les plantes issues de A4 (36 plantes), on observe à la fois une variation plus réduite de la taille des pétioles et un pourcentage plus faible de cellules polyploïdes, ce qui indique que le degré d'endoploïdie peut affecter directement la taille
20 finale des organes végétaux.

12 des 36 plantes T1 issues de A4 contiennent moins de 6% de noyaux endorépliqués (>4C) dans leurs pétioles (Figure 6B). Ces plantes [A4(s)] ont été regroupées et analysées séparément du reste des plantes
25 A4 T1 [A4(w)] qui présentent des altérations phénotypiques moins importantes.

La Figure 6C montre que la largeur des pétioles chez les plantes A4(w) est comparable à celle des plantes témoin diploïdes C_{2n} ; en revanche, la largeur
30 des pétioles chez les plantes A4(s) est significativement inférieure à celle des plantes témoin diploïdes C_{2n}. et la largeur des pétioles chez les plantes témoin tétraploïdes C_{4n}, est significativement supérieure à celle observée chez les plantes diploïdes.

35 La taille des feuilles (qui ne contiennent pas de cellules endorépliquées et dont l'endoploïdie n'est

donc pas affectée par le niveau d'expression de CCS52) a également été mesurée. Dans ce cas on n'observe aucune différence significative entre les plantes A4(w), A4(s), et les plantes témoin diploïdes C_{2n} . en revanche la taille
5 des feuilles est significativement plus importante chez les plantes témoin tétraploïdes C_{4n} .

Ces résultats montrent que l'endoploïdie affecte la taille des organes végétaux, et que la modification de l'expression de CCS52 agit à ce niveau
10 par l'intermédiaire d'une modification de l'endoploïdie.

2° Expression de la protéine CCS52Ms dans des plantes transgéniques.

Des vecteurs d'expression contenant le gène *ccs52Ms* sous contrôle du promoteur 35S, ainsi que des
15 vecteurs d'expression comprenant le gène *ccs52Ms*, sous contrôle d'un promoteur tissu-spécifique, ont été construits selon le protocole suivant :

Pour l'expression tissu-spécifique de CCS52Ms, l'ADNc est placé sous le contrôle des promoteurs
20 *enod12AMs* et *Srg1b3* décrits par TRINH et al. [Plant Cell Reports, 17, pp. 345-355, (1998)], en utilisant comme vecteur pISV-BMCS, un dérivé de pISV2301, et, au lieu du promoteur *enod12AMs* complet, seulement un fragment de 0,3 kb de celui-ci, considéré comme suffisant pour une
25 expression nodosité-spécifique [VIJN et al., Plant Mol. Biol., 28, pp. 1103-1110, (1995)].

Construction de pISV-BMCS : pISV2301 est digéré par HindIII et SstI pour éliminer la séquence du promoteur 2X35S-AMV, qui est remplacé par l'oligonucléotide BMCS
30 double-brin suivant :

AGCTTCCCGGGGAGCTCTAGACTCGAGCAGCT

AGGCCCTCGAGATCTGAGCTCG.

Cet oligonucléotide contient les sites SmaI, SstI, XbaI, XhoI.

35 pISV-BMCS12A est construit par clonage dans pISV-BMCS d'un fragment du promoteur *enod12AMs* de 0,3 kb;

obtenu à partir du plasmide pPR89 [BAUER et al., Plant J., 10, pp. 91-105, (1996)] .

pISV-BMCS-LB3 est construit par digestion de pISV-BMCS avec HindIII-SstI et clonage d'un fragment
5 HindIII-SstI contenant le promoteur leghémoglobine de *Sesbania rostrata* à partir de pLP32 [TRINH et al, Plant Cell Reports, 17, pp. 345-355, (1998)].

Ces vecteurs ont été utilisés pour transformer *Medicago truncatula* selon le protocole décrit ci-dessus
10 pour les séquences antisens.

Lors de la régénération des plantes transgéniques, on observe une conversion des cals en embryons significativement plus importante chez les plantes transformées avec les constructions exprimant le
15 gène *ccs52Ms*, que chez les plantes transformées avec la construction témoin, ce qui indique un effet positif de *CCS52Ms* sur l'embryogénèse somatique.

REVENDICATIONS

- 1) Protéine végétale à motifs WD40 répétés, caractérisée en ce qu'elle appartient à la sous-famille FZR.
- 5 2) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle présente au moins 45%, et de préférence au moins 55% d'identité avec le polypeptide de séquence SEQ ID NO:2 ou au moins 60% et de préférence au moins 70 % de similarité avec le polypeptide de séquence
- 10 SEQ ID NO:2.
- 3) Fragment d'acide nucléique purifié caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence codant pour une protéine selon la revendication 1, ou de sa séquence complémentaire.
- 15 4) Vecteur recombinant contenant un fragment d'acide nucléique selon la revendication 3.
- 5) Cellule transformée par au moins un fragment d'acide nucléique selon la revendication 3.
- 6) Cellule transformée selon la revendication
- 20 5, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule végétale.
- 7) Plante transgénique transformée par au moins un fragment d'acide nucléique selon la revendication 3.
- 25 8) Utilisation d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, ou d'une séquence d'acide nucléique selon la revendication 3, pour réguler la différenciation et la prolifération de cellules végétales.
- 30 9) Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ladite protéine ou ladite séquence d'acide nucléique est utilisée pour favoriser l'endoploïdie dans les cellules d'une plante ou d'un tissu végétal.
- 35 10) Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ladite protéine ou ladite séquence

d'acide nucléique est utilisée pour favoriser la régénération *in vitro* de plantes à partir de cals en culture.

- 11) Utilisation d'une protéine de la sous-
5 famille FZR ou d'une séquence d'acide nucléique codant pour tout ou partie de ladite protéine, ou de sa séquence complémentaire, pour réguler la différenciation et la prolifération de cellules végétales.

1/8

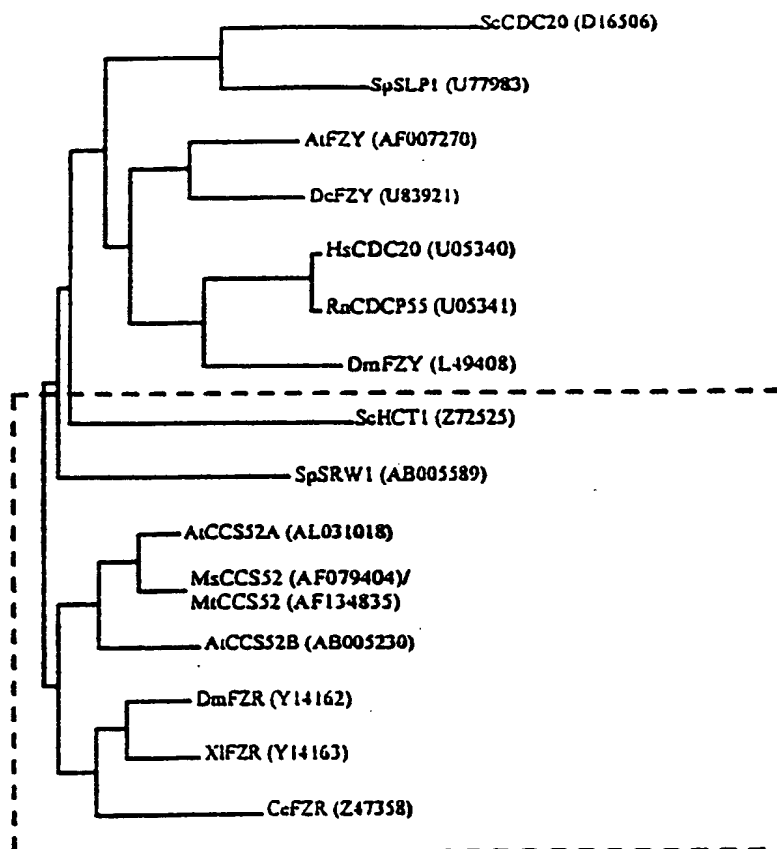


Figure 1A



WD40-2		WD40-3	
148	AtPZY	289	SpSMT1
149	DmPZY	290	SCHCT1
150	AtCC852		
151	AtCC852A		
152	AtCC852B		
153	DmPZY		
154	AtCC852		
155	AtCC852A		
156	AtCC852B		
157	DmPZY		
158	AtCC852		
159	AtCC852A		
160	AtCC852B		
161	DmPZY		
162	AtCC852		
163	AtCC852A		
164	AtCC852B		
165	DmPZY		
166	AtCC852		
167	AtCC852A		
168	AtCC852B		
169	DmPZY		
170	AtCC852		
171	AtCC852A		
172	AtCC852B		
173	DmPZY		
174	AtCC852		
175	AtCC852A		
176	AtCC852B		
177	DmPZY		
178	AtCC852		
179	AtCC852A		
180	AtCC852B		
181	DmPZY		
182	AtCC852		
183	AtCC852A		
184	AtCC852B		
185	DmPZY		
186	AtCC852		
187	AtCC852A		
188	AtCC852B		
189	DmPZY		
190	AtCC852		
191	AtCC852A		
192	AtCC852B		
193	DmPZY		
194	AtCC852		
195	AtCC852A		
196	AtCC852B		
197	DmPZY		
198	AtCC852		
199	AtCC852A		
200	AtCC852B		
201	DmPZY		
202	AtCC852		
203	AtCC852A		
204	AtCC852B		
205	DmPZY		
206	AtCC852		
207	AtCC852A		
208	AtCC852B		
209	DmPZY		
210	AtCC852		
211	AtCC852A		
212	AtCC852B		
213	DmPZY		
214	AtCC852		
215	AtCC852A		
216	AtCC852B		
217	DmPZY		
218	AtCC852		
219	AtCC852A		
220	AtCC852B		
221	DmPZY		
222	AtCC852		
223	AtCC852A		
224	AtCC852B		
225	DmPZY		
226	AtCC852		
227	AtCC852A		
228	AtCC852B		
229	DmPZY		
230	AtCC852		
231	AtCC852A		
232	AtCC852B		
233	DmPZY		
234	AtCC852		
235	AtCC852A		
236	AtCC852B		
237	DmPZY		
238	AtCC852		
239	AtCC852A		
240	AtCC852B		
241	DmPZY		
242	AtCC852		
243	AtCC852A		
244	AtCC852B		
245	DmPZY		
246	AtCC852		
247	AtCC852A		
248	AtCC852B		
249	DmPZY		
250	AtCC852		
251	AtCC852A		
252	AtCC852B		
253	DmPZY		
254	AtCC852		
255	AtCC852A		
256	AtCC852B		
257	DmPZY		
258	AtCC852		
259	AtCC852A		
260	AtCC852B		
261	DmPZY		
262	AtCC852		
263	AtCC852A		
264	AtCC852B		
265	DmPZY		
266	AtCC852		
267	AtCC852A		
268	AtCC852B		
269	DmPZY		
270	AtCC852		
271	AtCC852A		
272	AtCC852B		
273	DmPZY		
274	AtCC852		
275	AtCC852A		
276	AtCC852B		
277	DmPZY		
278	AtCC852		
279	AtCC852A		
280	AtCC852B		
281	DmPZY		
282	AtCC852		
283	AtCC852A		
284	AtCC852B		
285	DmPZY		
286	AtCC852		
287	AtCC852A		
288	AtCC852B		
289	DmPZY		
290	AtCC852		
291	AtCC852A		
292	AtCC852B		
293	DmPZY		
294	AtCC852		
295	AtCC852A		
296	AtCC852B		
297	DmPZY		
298	AtCC852		
299	AtCC852A		
300	AtCC852B		
301	DmPZY		
302	AtCC852		
303	AtCC852A		
304	AtCC852B		
305	DmPZY		
306	AtCC852		
307	AtCC852A		
308	AtCC852B		
309	DmPZY		
310	AtCC852		
311	AtCC852A		
312	AtCC852B		
313	DmPZY		
314	AtCC852		
315	AtCC852A		
316	AtCC852B		
317	DmPZY		
318	AtCC852		
319	AtCC852A		
320	AtCC852B		
321	DmPZY		
322	AtCC852		
323	AtCC852A		
324	AtCC852B		
325	DmPZY		
326	AtCC852		
327	AtCC852A		
328	AtCC852B		
329	DmPZY		
330	AtCC852		
331	AtCC852A		
332	AtCC852B		
333	DmPZY		
334	AtCC852		
335	AtCC852A		
336	AtCC852B		
337	DmPZY		
338	AtCC852		
339	AtCC852A		
340	AtCC852B		
341	DmPZY		
342	AtCC852		
343	AtCC852A		
344	AtCC852B		
345	DmPZY		
346	AtCC852		
347	AtCC852A		
348	AtCC852B		
349	DmPZY		
350	AtCC852		
351	AtCC852A		
352	AtCC852B		
353	DmPZY		
354	AtCC852		
355	AtCC852A		
356	AtCC852B		
357	DmPZY		
358	AtCC852		
359	AtCC852A		
360	AtCC852B		
361	DmPZY		
362	AtCC852		
363	AtCC852A		
364	AtCC852B		
365	DmPZY		
366	AtCC852		
367	AtCC852A		
368	AtCC852B		
369	DmPZY		
370	AtCC852		
371	AtCC852A		
372	AtCC852B		
373	DmPZY		
374	AtCC852		
375	AtCC852A		
376	AtCC852B		
377	DmPZY		
378	AtCC852		
379	AtCC852A		
380	AtCC852B		
381	DmPZY		
382	AtCC852		
383	AtCC852A		
384	AtCC852B		
385	DmPZY		
386	AtCC852		
387	AtCC852A		
388	AtCC852B		
389	DmPZY		
390	AtCC852		
391	AtCC852A		
392	AtCC852B		
393	DmPZY		
394	AtCC852		
395	AtCC852A		
396	AtCC852B		
397	DmPZY		
398	AtCC852		
399	AtCC852A		
400	AtCC852B		
401	DmPZY		
402	AtCC852		
403	AtCC852A		
404	AtCC852B		
405	DmPZY		
406	AtCC852		
407	AtCC852A		
408	AtCC852B		
409	DmPZY		
410	AtCC852		
411	AtCC852A		
412	AtCC852B		
413	DmPZY		
414	AtCC852		
415	AtCC852A		
416	AtCC852B		
417	DmPZY		
418	AtCC852		
419	AtCC852A		
420	AtCC852B		
421	DmPZY		
422	AtCC852		
423	AtCC852A		
424	AtCC852B		
425	DmPZY		
426	AtCC852		
427	AtCC852A		
428	AtCC852B		
429	DmPZY		
430	AtCC852		
431	AtCC852A		
432	AtCC852B		
433	DmPZY		
434	AtCC852		
435	AtCC852A		
436	AtCC852B		
437	DmPZY		
438	AtCC852		
439	AtCC852A		
440	AtCC852B		
441	DmPZY		
442	AtCC852		
443	AtCC852A		
444	AtCC852B		
445	DmPZY		
446	AtCC852		
447	AtCC852A		
448	AtCC852B		
449	DmPZY		
450	AtCC852		
451	AtCC852A		
452	AtCC852B		
453	DmPZY		
454	AtCC852		
455	AtCC852A		
456	AtCC852B		
457	DmPZY		
458	AtCC852		
459	AtCC852A		
460	AtCC852B		
461	DmPZY		
462	AtCC852		
463	AtCC852A		
464	AtCC852B		
465	DmPZY		
466	AtCC852		
467	AtCC852A		
468	AtCC852B		
469	DmPZY		
470	AtCC852		
471	AtCC852A		
472	AtCC852B		
473	DmPZY		
474	AtCC852		
475	AtCC852A		
476	AtCC852B		
477	DmPZY		
478	AtCC852		
479	AtCC852A		
480	AtCC852B		
481	DmPZY		
482	AtCC852		
483	AtCC852A		
484	AtCC852B		
485	DmPZY		
486	AtCC852		
487	AtCC852A		
488	AtCC852B		
489	DmPZY		
490	AtCC852		
491	AtCC852A		
492	AtCC852B		
493	DmPZY		
494	AtCC852		
495	AtCC852A		
496	AtCC852B		
497	DmPZY		
498	AtCC852		
499	AtCC852A		
500	AtCC852B		
501	DmPZY		
502	AtCC852		
503	AtCC852A		
504	AtCC852B		
505	DmPZY		
506	AtCC852		
507	AtCC852A		
508	AtCC852B		
509	DmPZY		
510	AtCC852		
511	AtCC852A		
512	AtCC852B		
513	DmPZY		
514	AtCC852		
515	AtCC852A		
516	AtCC852B		
517	DmPZY		
518	AtCC852		
519	AtCC852A		
520	AtCC852B		
521	DmPZY		
522	AtCC852		
523	AtCC852A		
524	AtCC852B		
525	DmPZY		
526	AtCC852		
527	At		



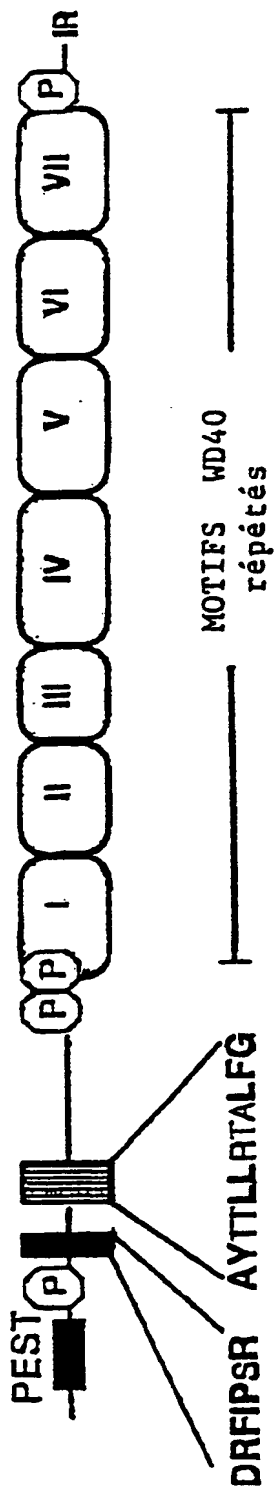


Figure 2



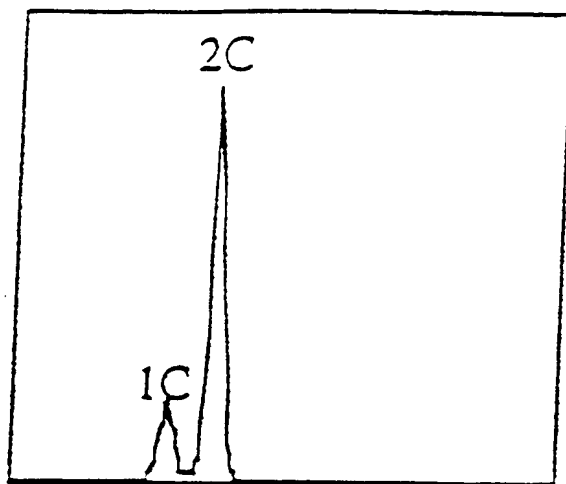


Figure 3A

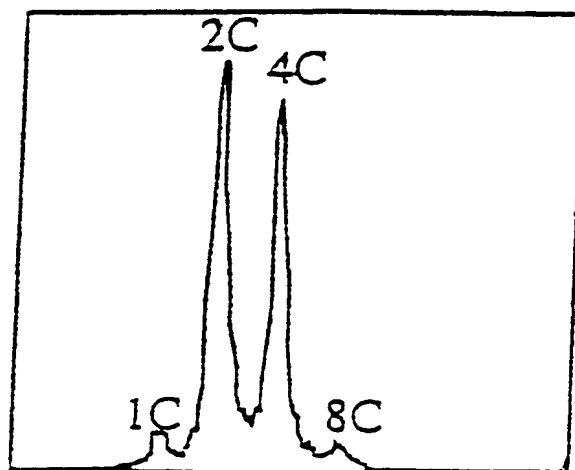


Figure 3B



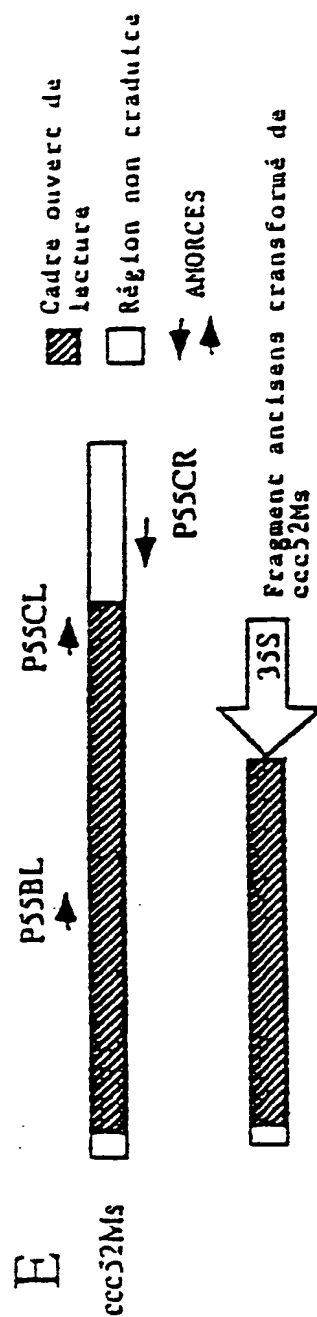
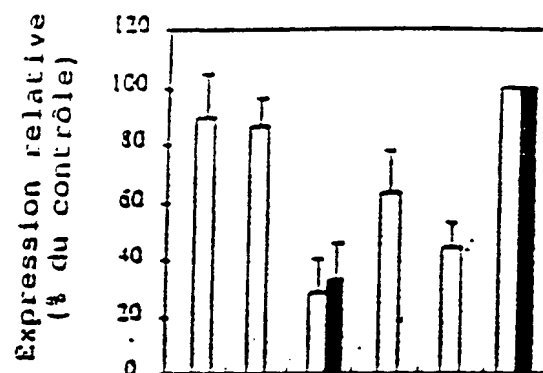


Figure 4





% Noyaux	A1	A3	A4	A7	A32	C _{2n}
8c	13.6	13.6	1.2	13.3	7.5	15.8
16c	3.8	3.2	0	0.5	0	4.1

Figure 5A

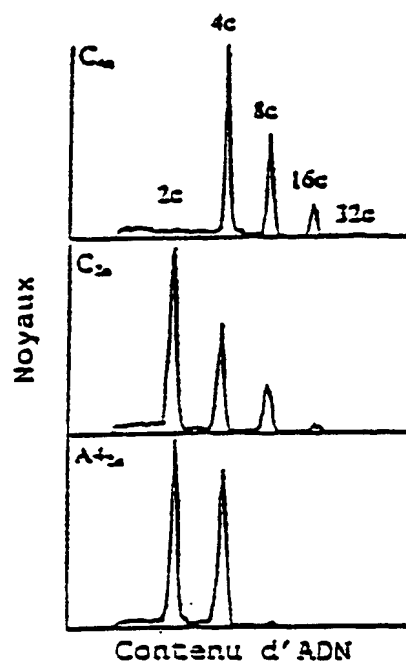


Figure 5B



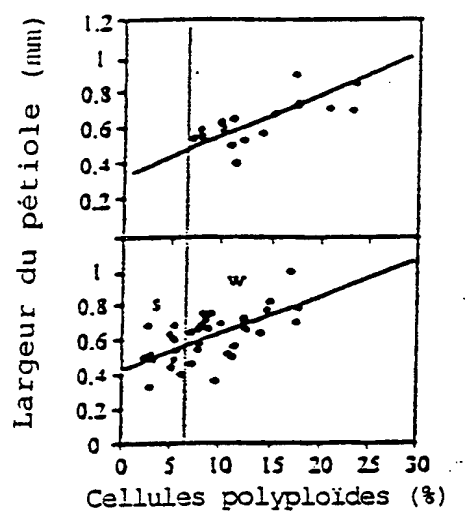


Figure 6A

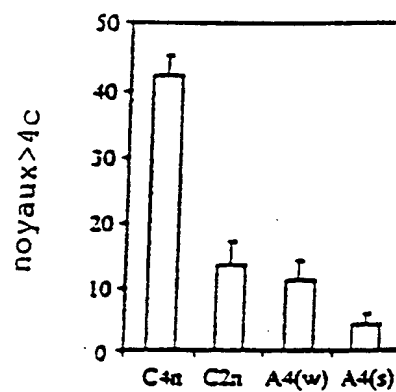


Figure 6B

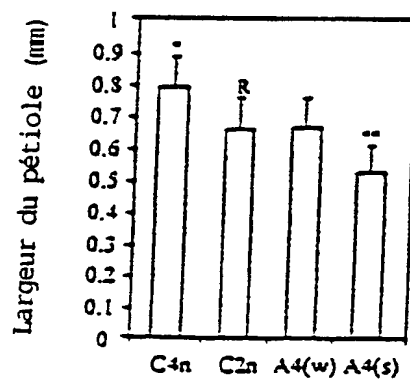


Figure 6C



LISTE DE SEQUENCES

<110> CNRS
KONDOROSI, Eva
CEBOLLA, Angel
KONDOROSI, Adam

<120> Protéine végétale à motifs WD40 répétés, acide
nucléique codant pour ladite protéine, et leurs
applications.

<130> MJPCb644/39

<140>

<141>

<150> FR9807174

<151> 1998-06-08

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2006

<212> ADN

<213> Medicago sativa

<220>

<221> CDS

<222> (182)..(1609)

<400> 1

```

gattcggcac gaggaagaaa caaagaaact ctctctctct atttctttct ctctgcacaa 60
ttttcgagta gtgttatttt ttaataaaaa attaattaat ttttttttat ataaaagccg 120
tgcaaaaaaat tcttttacag cgttcttttt tccccgggaa aaaaattaac acagctccgc 180
c atg gac gga acc ggt aat cga aat cca cca ccg act tcc acc gtc aga 229
Met Asp Gly Thr Gly Asn Arg Asn Pro Pro Pro Thr Ser Thr Val Arg
  1             5             10             15

gac aat tct cca ccg cct gag cca tca ccg gag agt ctc cgt cat gta 277
Asp Asn Ser Pro Pro Pro Glu Pro Ser Pro Glu Ser Leu Arg His Val
      20             25             30

agc cgt atg atc aac agc aac cat tac acc tca cct tct cga aca atc 325
Ser Arg Met Ile Asn Ser Asn His Tyr Thr Ser Pro Ser Arg Thr Ile
      35             40             45

tac tcc gat agg ttc att ccg agt aga tct gct tcg aaa ttc gct ttg 373
Tyr Ser Asp Arg Phe Ile Pro Ser Arg Ser Ala Ser Lys Phe Ala Leu
      50             55             60

ttt gat atc aat act ccg aca gaa gga cgc gat gat agt tcc agc gct 421
Phe Asp Ile Asn Thr Pro Thr Glu Gly Arg Asp Asp Ser Ser Ser Ala
      65             70             75             80

```



tat acg act ctt ctg aga acg gcg ttg ttt gga ccg gat gtt gcc ggt	469
Tyr Thr Thr Leu Leu Arg Thr Ala Leu Phe Gly Pro Asp Val Ala Gly	
85 90 95	
ccg gtt acg ccg gaa aaa acc gac tcg ccg tcg atg aca ttg ccg aat	517
Pro Val Thr Pro Glu Lys Thr Asp Ser Pro Ser Met Thr Leu Pro Asn	
100 105 110	
agg aat att ttt agg tat aag acg gag acg aga cag tcc atg cac tcg	565
Arg Asn Ile Phe Arg Tyr Lys Thr Glu Thr Arg Gln Ser Met His Ser	
115 120 125	
ctt tcg ccg ttt atg gat gat gat ttt gtt cct ggt gtt aat cat agt	613
Leu Ser Pro Phe Met Asp Asp Asp Phe Val Pro Gly Val Asn His Ser	
130 135 140	
ccg gtt aag gct cct agg aag gtt cct cga tcg cct tat aag gtt ttg	661
Pro Val Lys Ala Pro Arg Lys Val Pro Arg Ser Pro Tyr Lys Val Leu	
145 150 155 160	
gat gca cct gct ttg caa gat gat ttt tat ctg aat ctg gta gat tgg	709
Asp Ala Pro Ala Leu Gln Asp Asp Phe Tyr Leu Asn Leu Val Asp Trp	
165 170 175	
tct tca cac aat gtg ttg gct gtt ggt ttg ggt aac tgt gtc tat ctc	757
Ser Ser His Asn Val Leu Ala Val Gly Leu Gly Asn Cys Val Tyr Leu	
180 185 190	
tgg aat gct tgt agc agc aag gta act aaa tta tgt gat ttg ggg gtt	805
Trp Asn Ala Cys Ser Ser Lys Val Thr Lys Leu Cys Asp Leu Gly Val	
195 200 205	
gat gat tgt gtt tgt tct gtt ggt tgg gct caa cgt ggt act cat ctt	853
Asp Asp Cys Val Cys Ser Val Gly Trp Ala Gln Arg Gly Thr His Leu	
210 215 220	
gct gtt gga act aac aat ggt aaa gtt cag att tgg gat gca gca aga	901
Ala Val Gly Thr Asn Asn Gly Lys Val Gln Ile Trp Asp Ala Ala Arg	
225 230 235 240	
tgc aag aag ata aga tca atg gag ggc cat cgg tta cgt gtc ggg gcc	949
Cys Lys Lys Ile Arg Ser Met Glu Gly His Arg Leu Arg Val Gly Ala	
245 250 255	
ttg gcc tgg agt tca tct ctt ttg tct tct ggt gga cgg gat aag aat	997
Leu Ala Trp Ser Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Gly Arg Asp Lys Asn	
260 265 270	
att tat caa cga gat ata cgc aca caa gaa gat ttt gtt agt aaa ctg	1045
Ile Tyr Gln Arg Asp Ile Arg Thr Gln Glu Asp Phe Val Ser Lys Leu	
275 280 285	
tca gga cac aaa tca gag gtt tgt gga ctg aag tgg tca tat gat aac	1093
Ser Gly His Lys Ser Glu Val Cys Gly Leu Lys Trp Ser Tyr Asp Asn	
290 295 300	
cgt gag ttg gca tct gga gga aat gac aac aaa ttg ttt gtt tgg aat	1141
Arg Glu Leu Ala Ser Gly Gly Asn Asp Asn Lys Leu Phe Val Trp Asn	
305 310 315 320	

caa cac tca acc cag cct gtc ctc aag tac tgt gag cac aca gca gct 1189
 Gln His Ser Thr Gln Pro Val Leu Lys Tyr Cys Glu His Thr Ala Ala
 325 330 335

gtt aaa gct att gca tgg tct cct cat ctt cat gga ctt ctt gca tct 1237
 Val Lys Ala Ile Ala Trp Ser Pro His Leu His Gly Leu Leu Ala Ser
 340 345 350

gga gga gga act gca gat aga tgt att cgt ttt tgg aat aca acc aca 1285
 Gly Gly Gly Thr Ala Asp Arg Cys Ile Arg Phe Trp Asn Thr Thr Thr
 355 360 365

aac tca cac ctt agc tgt atg gac act gga agt cag gtt tgc aat ctt 1333
 Asn Ser His Leu Ser Cys Met Asp Thr Gly Ser Gln Val Cys Asn Leu
 370 375 380

gtc tgg tcc aaa aat gtc aac gaa cta gta agc aca cat ggg tac tcc 1381
 Val Trp Ser Lys Asn Val Asn Glu Leu Val Ser Thr His Gly Tyr Ser
 385 390 395 400

cag aac cag att att gtt tgg aga tac ccc act atg tca aag ctg gcg 1429
 Gln Asn Gln Ile Ile Val Trp Arg Tyr Pro Thr Met Ser Lys Leu Ala
 405 410 415

act ctt acc ggc cat act tat agg gtt ctc tat ctt gcc atc tct cca 1477
 Thr Leu Thr Gly His Thr Tyr Arg Val Leu Tyr Leu Ala Ile Ser Pro
 420 425 430

gat gga cag act att gta act gga gct gga gat gaa acg ctt agg ttc 1525
 Asp Gly Gln Thr Ile Val Thr Gly Ala Gly Asp Glu Thr Leu Arg Phe
 435 440 445

tgg aat gtt ttc cct tcc cct aaa tca cag aat act gaa agt gaa atc 1573
 Trp Asn Val Phe Pro Ser Pro Lys Ser Gln Asn Thr Glu Ser Glu Ile
 450 455 460

gga gca tta tct ctt gga aga act act atc agg tga ttgatcctgg 1619
 Gly Ala Leu Ser Leu Gly Arg Thr Thr Ile Arg
 465 470 475

cgttgcagcc caatcatgtg gcatatttct aagtttgggt tgctgtgtag aactaaattt 1679

ctgagcggag aacaccatgg tggaaaaacc ttgaatataa aaacaccacc aaagtagcat 1739

ctttaccaac tgggagagcc ttggagggag ctataaaagt tttgatatgg ctgccggtga 1799

tattcctgca ttcatgtgta gtctcatttt atattgaaaa gatgataaca aatgggtaat 1859

ttattgtctt ggacttatac atgcattgat ggagttgtag ccaagttttt ttattactct 1919

ttttttcttt cttctttttg atagtgtctt cctgcattat ttatataatt ttaagatgcg 1979

ttaacagaga aaaaaaaaaa aaaaaaa 2006

<210> 2
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> Medicago sativa
 <400> 2



WO 99/64451

PCT/FR99/01342

Met Asp Gly Thr Gly Asn Arg Asn Pro Pro Pro Thr Ser Thr Val Arg
 1 5 10 15
 Asp Asn Ser Pro Pro Pro Glu Pro Ser Pro Glu Ser Leu Arg His Val
 20 25 30
 Ser Arg Met Ile Asn Ser Asn His Tyr Thr Ser Pro Ser Arg Thr Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Asp Arg Phe Ile Pro Ser Arg Ser Ala Ser Lys Phe Ala Leu
 50 55 60
 Phe Asp Ile Asn Thr Pro Thr Glu Gly Arg Asp Asp Ser Ser Ser Ala
 65 70 75 80
 Tyr Thr Thr Leu Leu Arg Thr Ala Leu Phe Gly Pro Asp Val Ala Gly
 85 90 95
 Pro Val Thr Pro Glu Lys Thr Asp Ser Pro Ser Met Thr Leu Pro Asn
 100 105 110
 Arg Asn Ile Phe Arg Tyr Lys Thr Glu Thr Arg Gln Ser Met His Ser
 115 120 125
 Leu Ser Pro Phe Met Asp Asp Asp Phe Val Pro Gly Val Asn His Ser
 130 135 140
 Pro Val Lys Ala Pro Arg Lys Val Pro Arg Ser Pro Tyr Lys Val Leu
 145 150 155 160
 Asp Ala Pro Ala Leu Gln Asp Asp Phe Tyr Leu Asn Leu Val Asp Trp
 165 170 175
 Ser Ser His Asn Val Leu Ala Val Gly Leu Gly Asn Cys Val Tyr Leu
 180 185 190
 Trp Asn Ala Cys Ser Ser Lys Val Thr Lys Leu Cys Asp Leu Gly Val
 195 200 205
 Asp Asp Cys Val Cys Ser Val Gly Trp Ala Gln Arg Gly Thr His Leu
 210 215 220
 Ala Val Gly Thr Asn Asn Gly Lys Val Gln Ile Trp Asp Ala Ala Arg
 225 230 235 240
 Cys Lys Lys Ile Arg Ser Met Glu Gly His Arg Leu Arg Val Gly Ala
 245 250 255
 Leu Ala Trp Ser Ser Ser Leu Leu Ser Ser Gly Gly Arg Asp Lys Asn
 260 265 270
 Ile Tyr Gln Arg Asp Ile Arg Thr Gln Glu Asp Phe Val Ser Lys Leu
 275 280 285
 Ser Gly His Lys Ser Glu Val Cys Gly Leu Lys Trp Ser Tyr Asp Asn
 290 295 300
 Arg Glu Leu Ala Ser Gly Gly Asn Asp Asn Lys Leu Phe Val Trp Asn
 305 310 315 320



WO 99/64451

PCT/FR99/01342

Gln His Ser Thr Gln Pro Val Leu Lys Tyr Cys Glu His Thr Ala Ala
 325 330 335
 Val Lys Ala Ile Ala Trp Ser Pro His Leu His Gly Leu Leu Ala Ser
 340 345 350
 Gly Gly Gly Thr Ala Asp Arg Cys Ile Arg Phe Trp Asn Thr Thr Thr
 355 360 365
 Asn Ser His Leu Ser Cys Met Asp Thr Gly Ser Gln Val Cys Asn Leu
 370 375 380
 Val Trp Ser Lys Asn Val Asn Glu Leu Val Ser Thr His Gly Tyr Ser
 385 390 395 400
 Gln Asn Gln Ile Ile Val Trp Arg Tyr Pro Thr Met Ser Lys Leu Ala
 405 410 415
 Thr Leu Thr Gly His Thr Tyr Arg Val Leu Tyr Leu Ala Ile Ser Pro
 420 425 430
 Asp Gly Gln Thr Ile Val Thr Gly Ala Gly Asp Glu Thr Leu Arg Phe
 435 440 445
 Trp Asn Val Phe Pro Ser Pro Lys Ser Gln Asn Thr Glu Ser Glu Ile
 450 455 460
 Gly Ala Leu Ser Leu Gly Arg Thr Thr Ile Arg
 465 470 475



1
2
3

4
5
6